

SAH

#4

3-7-02



**BEST AVAILABLE COPY**

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 07 296.5

**Anmeldetag:** 22. Februar 1999

**Anmelder/Inhaber:** Evotec BioSystems AG, Hamburg/DE

**Bezeichnung:** Verwendung von Trägermaterial in der Kapillar-  
Elektrochromatographie

**IPC:** G 01 N, B 01 D

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 11. Oktober 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Brand**

## Verwendung von Trägermaterial in der Kapillar-Elektrochromatographie

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Trägermaterialien in der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC).

Im allgemeinen sind Analysenmethoden im günstigsten Fall selektiv; nur wenige, wenn überhaupt, sind jedoch wirklich spezifisch. Folglich ist im Rahmen einer Analyse die Abtrennung des Analyten von störenden Begleitsubstanzen unumgänglich.

In chromatographischen Trennungen wird die Probe in einer mobilen Phase gelöst, bei der es sich z. B. um ein Gas, eine Flüssigkeit oder ein überkritisches Fluid handeln kann. Die mobile Phase wird durch eine mit ihr nicht mischbare stationäre Phase bewegt, die sich z. B. in einer Säule befindet oder an einer festen Oberfläche fixiert ist. Die beiden Phasen werden so gewählt, daß sich die Probenkomponenten in verschiedenem Maße zwischen der mobilen und stationären Phase verteilen. Die Komponenten, die von der stationären Phase in starkem Maße zurückgehalten werden, bewegen sich nur langsam mit der mobilen Phase weiter. Demgegenüber bewegen sich die Komponenten, die nur schwach von der stationären Phase zurückgehalten werden, schnell. Aufgrund dieser Unterschiede trennen sich die Probenkomponenten in diskrete Banden auf.

Ein Chromatographiekonzept, das die Vorteile der Kapillarflüssigkeitschromatographie (z. B. HPLC) und der Kapillarelektrophorese (CE) verbindet, ist die sogenannte Kapillar-Elektrochromatographie (CEC). Im wesentlichen kann CEC als Hybrid aus HPLC und CE angesehen werden (Colon *et al.*, Analytical Chemistry News & Features 1995; August 1, 461A-467A). Wie in der HPLC werden die Komponenten einer Probe durch unterschiedliche Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt. Zusätzlich wird aber, wie in der CE, durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluß erzeugt. Die Trennungen können isokratisch oder mit einem Gradienten durchgeführt werden. Die Säulen sind bevorzugt mit Kieselgelpartikeln gefüllt, die typischerweise Partikeldurchmesser im Bereich von 1 bis 5 µm haben.

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Trennung von anionischen, kationischen und neutralen Molekülen. Allerdings besteht ein großes Problem in der Analyse komplexer, insbesondere biologischer Proben. Diese, wie z. B. hämolysiertes Blut, Plasma, Serum, Milch, Speichel, Fermenterbrühe, Urin, Überstände von Zellkultur-, Lebensmittel- und Gewebehomogenaten oder Naturstoffextrakte, enthalten neben dem Analyten einen großen Anteil an Matrixkomponenten, wie Proteine und Salze.

Proteine und andere Makromoleküle werden z. B. durch hohe Anteile von organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase ausgefällt oder durch Restsilanolgruppen an der Oberfläche eines chromatographischen Trägers unspezifisch, irreversibel gebunden oder denaturiert. Sie blockieren bei Verwendung einer porösen stationären Phase den Zugang zu den Poren und verringern damit die Anzahl der chromatographischen Adsorptionszentren. Durch den damit verbundenen verringerten Stoffaustausch zwischen stationärer und mobiler Phase führen diese Vorgänge zu einem Kapazitäts- und Selektivitätsverlust der Säule. Nichtspezifische Adsorption führt darüber hinaus zu Schwankungen des elektroosmotischen Flusses und zu nicht reproduzierbaren Retentionszeiten der Analyten. In allen Fällen wird die CEC-Säule schwer geschädigt oder unbrauchbar gemacht. Daher ist es notwendig, diese Matrixkomponenten vor der CEC-Analyse aus der Probe zu entfernen.

Diese Problematik wirkt umso schwerer, da sie Bestimmungen betrifft, die in großer Anzahl durchgeführt werden: z. B. Therapiekontrolle, Bestimmung von körpereigenen Substanzen oder auch das Hochdurchsatzscreening nach potentiellen pharmakologischen Wirkstoffen, insbesondere unter Verwendung von Naturstoffextrakten.

Gängige Probenaufbereitungsverfahren sind z. B. Kartuschenverfahren oder die Verwendung von Vorsäulen, die vorzugsweise mit Kieselgelpartikeln gefüllt sind, wobei die Elution des Analyten bevorzugt durch Flüssigdesorption (HPLC) erfolgt.

Allerdings sind die notwendigen Probenvorbehandlungsschritte oft zeit-, kosten- und arbeitsintensiv und führen durch den notwendigen Transfer des Analyten auf eine

Trennsäule zu einer Volumenvergrößerung der Probe, die zu einem Verlust an Selektivität und Empfindlichkeit des Trennverfahrens führt.

Boos et al. (LC-GC 1997,15, 602-611; LC-GC 1996,14, 554-560) beschreiben ein Trägermaterial auf Alkyl-Diol-Silika-Basis (ADS), das quantitative Abtrennung von Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen gewährleistet. Es zeichnet sich durch eine für Biomoleküle inerte Oberfläche aus und ist in den Poren mit Alkylgruppen belegt. Die Porengröße ermöglicht kleinen Zielmolekülen (Analyten) Zugang, während die großen Matrixmoleküle ausgeschlossen bleiben. Dieses Material wurde speziell für LC-Analysen entwickelt.

Die Verfahren der Kapillar-Elektrochromatographie und der HPLC unterscheiden sich insbesondere durch die in der CEC auftretenden elektroosmotischen Kräfte erheblich voneinander. Für die HPLC geeignete Materialien und Bedingungen sind somit nicht einfach auf das Verfahren der CEC zu übertragen (Colon et al. ,1997, Analytical Chemistry & Features, August 1).

Daher war es um so überraschender, daß die Verwendung von Trägermaterial, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine Oberfläche besitzt, die Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist, in der Kapillar-Elektrochromatographie eine quantitative Abtrennung des Analyten von anderen Probenkomponenten, insbesondere Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen (Probenmatrix) der Probe gewährleistet.

Der Begriff „Derivatisierung“ bezieht sich auf eine kovalente oder auch insbesondere adsorptive Bindung von Molekülen an der Oberfläche des Trägermaterials. Hierbei kann es sich beispielsweise um synthetische oder natürliche Polymere handeln, die als chemische Diffusionsbarriere verhindern, daß Makromoleküle der Probenmatrix am Trägermaterial adsorbieren bzw. denaturieren. Der Begriff „Funktionalisierung“ bezeichnet insbesondere die Eigenschaften eines jeweiligen Bereiches. So können bestimmte Bereiche des Trägermaterials hydrophob ausgestaltet sein, während andere Bereiche hy-

drophile Eigenschaften aufweisen. Eine derartige Funktionalisierung kann durch unterschiedliche Derivatisierung der Bereiche erzielt werden. Hierzu können verschiedene Moleküle (z. B. Fettsäuren in einem Bereich, Alkohole in einem anderen Bereich) eingesetzt werden. Es ist jedoch auch möglich, eine unterschiedliche Funktionalisierung durch Variation der Belegungsdichte von Bereichen mit gleichen Molekülen zu erzielen.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials in der CEC ermöglicht es, den Analyten von anderen Komponenten der Probe zu trennen, ohne diesen zu verdünnen.

Verbindung mit Isotachophorese ist es in einer Ausführungsform möglich, den Analyten ohne signifikante Erhöhung des Volumens auf eine Trennsäule, insbesondere eine weitere CEC-Säule oder eine  $\mu$ -HPLC-Säule, zu überführen. Es können sogar Proben volumina  $\leq 10 \mu\text{l}$  aufbereitet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung des Trägermaterials bleibt auch nach wiederholter Injektion komplexer Proben, insbesondere von serum- und zellkulturmedienhaltigen Proben, die Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Säule erhalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials erlaubt in einer weiteren Ausführungsform sogar die kombinierte Probenaufbereitung und -trennung von komplexen Proben auf einer einzigen CEC-Säule. Diese ist in Bezug auf Trennleistung, Empfindlichkeit, Signal-zu-Rausch-Verhältnis, Selektivität, Lebensdauer der Säule und Kosten der einer auf getrennten Säulen durchgeführten Probenaufbereitung und -trennung gleichgestellt oder sogar überlegen. Dies ermöglicht erstmals den Einsatz eines solchen Systems in Hochdurchsatz-Verfahren, wie z. B. dem Hochdurchsatzscreening nach potentiellen pharmakologisch aktiven Substanzen.

Es kann bevorzugt sein, die mittels CEC getrennten Analyten vorzugsweise vollautomatisch einer weiteren Analyse, insbesondere unter Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, zuzuführen, im Rahmen derer insbesondere die Wechsel-

wirkung des Analyten mit anderen Molekülen detektiert wird. Hierbei kann es sich z. B. um Rezeptor-Ligand-Interaktionen handeln.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials zeichnet sich somit insgesamt durch folgende Eigenschaften aus:

- es besteht die Möglichkeit der wiederholten direkten Injektion unbehandelter Proben, insbesondere biologischer Proben auf einer CEC-Säule,
- die Proteinmatrix wird quantitativ entfernt,
- der Analyt kann am oberen Rand der Säule aufkonzentriert und unabhängig von der Matrix quantitativ ab- und aufgetrennt werden,
- hohe Trennleistung, Empfindlichkeit, Genauigkeit, sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis,
- hohes Maß an Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Säule,
- automatischer Betrieb möglich,
- hohe Anzahl an Analysendurchgängen, kontinuierlicher Betrieb der Säule,
- geringe Kosten pro Analyse.

Besonders gute Trennergebnisse werden erzielt, wenn das Trägermaterial porös ausgestaltet ist, d. h. daß seine Oberfläche sich somit aus einer äußeren Oberfläche und einer Porenoberfläche zusammensetzt.

Es ist besonders vorteilhaft, wenn die Oberfläche des Trägermaterials mit hydrophoben und/oder hydrophilen Gruppen und/oder Ionenaustauscherguppen und/oder Affinitätsliganden derivatisiert und/oder funktionalisiert ist. Das Trägermaterial läßt sich somit individuell hinsichtlich seiner chemischen und/oder physikalischen Trenneigenschaften gestalten.

Die im folgenden aufgeführten funktionalen Gruppen sind besonders geeignet:

hydrophile Gruppen	hydrophobe Gruppen	Ionenaustauscher Gruppen	Affinitätsliganden
-Amide -Alkohole -Nitrile -Nitoalkyl	-Alkyl, besonders be vorzugt C1-C40 -Aryl, insbesondere -Phenyl, -Benzyl -Halogenide -SH -Ester, insbesondere Carbonsäureester -Alkoxy -Ketone	$-(CH_2)_xSO_3H$ $-(CF_2)_x-SO_3H$ $-(CH_2)_x-NR_3^+OH$ $-(CF_2)_x-CO_2H$ $-(CH_2)_x-CO_2H$ $- \text{C}_6\text{H}_4-CO-OH$  $R = -Alkyl, -H$ $x = 0 - 30$	-Antikörper -Fab-Fragmente -molecular imprinted polymer -Proteine -Rezeptoren -DNA -Oligonukleotide

Zur Auftrennung von Antigenen aus Serum ist es beispielweise bevorzugt, Trägermaterialien zu verwenden, die auf der Porenoberfläche durch polyklonale Antikörper funktionalisiert sind und deren äußere Oberfläche z. B. durch Diolgruppen hydrophil gestaltet ist.

Die Abtrennung des Reaktionsproduktes aus Synthesemischungen, die hydrophile Polymere, insbesondere Polyethylenglycol und hydrophile Reaktanden, wie beispielsweise Oligonukleotide enthalten, kann vorzugsweise durch Verwendung von Trägermaterialien geschehen, welche folgende Eigenschaften aufweisen: Die Porenoberfläche ist mit Diolen oder Zuckern derivatisiert. Ihre äußere Oberfläche weist durch Derivatisierung mit C8 Alkylresten hydrophobe Eigenschaften auf.

Zur Aufreinigung von Antisense Oligonukleotiden aus Serum ist es vorteilhaft Trägermaterialien zu verwenden, die sich durch eine hydrophile äußere Oberfläche, bevorzugt durch Derivatisierung mit Alkoholen, auszeichnen und eine Porenoberfläche aufweisen, die durch Anionentauscher, bevorzugt  $-NR_3^+ OH$ , mit  $R = -Ethyl, -Propyl$ , derivatisiert ist.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, Trägermaterial mit Bereichen unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität, die homogen oder heterogen auf seiner Oberfläche verteilt sind, in der CEC zu verwenden. So kann es beispielsweise wünschenswert sein, Trägermaterial zu verwenden, das Bereiche auf seiner Oberfläche aufweist, die eine funktionelle Gruppe in verschiedener Dichte enthalten.

Als Ausgangsmaterial können z. B. silikathaltige, insbesondere poröse, silikathaltige, Materialien eingesetzt werden. Diese können, wie in DE 4130475 beschrieben, an ihrer äußeren Oberfläche durch Hydroxylgruppen hydrophil gestaltet sein, während die Poren –und somit die innere Oberfläche– mit Fettsäureestern belegt ist.

Insbesondere können poröse Partikel aus mit 2,3 Dihydroxypropoxy-Gruppen modifiziertem Kieselgel oder Glas eingesetzt werden. Die Partikel können auch aus einem hydroxylgruppenhaltigen organischen Polymer oder Copolymer bestehen.

Als Ausgangsmaterial eignen sich auch hydrophile organische Copolymere aus beispielsweise Oligoethylenglycol, Glycidylmethacrylat oder Pentaerythroidimethacrylat. Diese können durch Acrylamidderivate der Formel  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NHR}$ , wobei R beispielsweise eine lineare und/oder verzweigt-kettige aliphatische Sulfonsäuregruppe und/oder Carbonsäuregruppe ist, funktionalisiert werden.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Trägermaterial dessen Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Alkylresten der Länge C1 bis C50, vorzugsweise C4 bis C22, besonders bevorzugt C4, C8 und C18 derivatisiert und/oder funktionalisiert sind. Insbesondere befinden sich die Alkylreste auf der inneren Oberfläche des Trägermaterial, d. h. in den Poren.

Es ist ebenfalls vorteilhaft, Trägermaterial zu verwenden, dessen Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Diolen derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.



Ebenfalls bevorzugt ist die Verwendung von Trägermaterial, welches im wesentlichen kugelförmig ausgestaltet ist, wobei besonders gute Trennergebnisse bei Verwendung von Trägermaterialien mit einem Außendurchmesser  $D$  von  $0.05 \leq D \leq 20 \mu\text{m}$ , bevorzugt  $0.1 \leq D \leq 5 \mu\text{m}$  erzielt werden. So können z. B. Trägermaterialien der Größe  $0.5 \leq D \leq 3 \mu\text{m}$  eingesetzt werden.

Ist das Trägermaterial porös ausgestaltet, so ist es vorteilhaft, daß es einen Porendurchmesser  $d$  von  $0.5 \leq d \leq 100 \text{ nm}$ , bevorzugt von  $1 \leq d \leq 50 \text{ nm}$ , besonders bevorzugt von  $2 \leq d \leq 6 \text{ nm}$  aufweist.

Vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Verwendung in einem CEC-Verfahren zur Probenaufbereitung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten,

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluß erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Transferpuffers eluiert wird.

Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung in einem CEC-Verfahren zur kombinierten Probenaufbereitung und Trennung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten,

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluß erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Elutionspuffers aufgetrennt und eluiert wird.

Das Aufbringen der Probe auf die Säule und das quantitative Entfernen der Matrix wird bevorzugt hydrodynamisch und/oder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch durchgeführt, was zu einer Aufkonzentrierung des Analyten um einen Faktor 10 bis 1000 führt.

Es kann aber auch bevorzugt sein, die Probe im Flash-back Verfahren auf die Säule aufzubringen und zu waschen. Dies vermindert eine mögliche Kontamination der Säule mit Matrixbestandteilen und führt ebenfalls zu einer Aufkonzentrierung der Probe am Kopf der Säule.

Es ist ebenfalls vorteilhaft, die Elution und Trennung der Analyten hydrodynamisch und/oder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch durchzuführen.

Besonders bevorzugt ist die elektroosmotische Elution und Trennung der Analyten, um auch bei Verwendung sehr kurzer Säulen, vorzugsweise  $\leq 10$  cm, eine ausreichende Bodenzahl zu erhalten.

In einer weiteren Ausführungsform wird während der Elution durch Isotachophorese eine weitere Aufkonzentrierung des Analyten um einen Faktor von 10 bis 1000 erreicht. Der Analyt kann so beispielsweise ohne große Volumenänderung von einer separaten Probenaufbereitungssäule auf eine Trennsäule überführt werden.

Zur Erhöhung der Selektivität des Verfahrens und/oder zur Erhöhung des elektroosmotischen Flusses werden bevorzugt auch Mischungen verschiedener Trägermaterialien als stationäre Phase eingesetzt.

Der besondere Vorteil dieser Mischungen ist es, daß sie eine optimale Anpassung an die Eigenschaften der mobile Phase und der Probe erlauben und somit eine empfindliche und selektive Trennung gewährleisten.

Die mobile Phase setzt sich vorzugsweise aus Puffersalzen in Gegenwart von anionischen und/oder kationischen und/oder zwitterionischen Ionenpaarreagenzien zusammen, wobei ihre Zusammensetzung der Natur und den Eigenschaften des Analyten zum Erhalt einer guten Trennleistung direkt angepaßt werden kann, wie dies z. B. die Ausführungsbeispiele belegen. Es ist aber auch möglich, bei unbekannten Zusammensetzungen des Analyten sogenannte universelle Puffer einzusetzen, die für die Trennung und Elution von Analyten unbekannter Zusammensetzung optimiert wurden.

Zur Erzielung besonders guter Trennergebnisse ist es auch wünschenswert, daß Waschpuffer und Elutionspuffer organische Lösungsmittel enthalten, wobei Waschpuffer mindestens 1% und Elutionspuffer mindestens 20% organisches Lösungsmittel enthalten sollten.

Insgesamt sollten in einer besonders bevorzugten Form des Verfahrens die stationäre und mobile Phase so gewählt werden, daß der elektroosmotische Fluß während Bindung und Elution des Analyten jeweils konstant bleibt oder sich reproduzierbar ändert, wobei ein elektroosmotischer Fluß im Bereich von 0.5 bis 10 mm/s bevorzugt ist. Zur Erzeugung des elektroosmotischen Flusses wird vorzugsweise eine Gleichstrom-Hochspannung eingesetzt.

Soll im Anschluß an Trennung und Elution eine Detektion der Analyte erfolgen, so ist es insbesondere bei massenspektrometrischer Detektion wünschenswert, daß die Puffersalze und/oder anionischen und/oder kationischen und/oder zwitterionischen Ionenpaarreagenzien bei Raumtemperatur flüchtig sind.

Zur genauen Charakterisierung der Zusammensetzung des Analyten sowohl qualitativ als auch quantitativ ist es in einer bevorzugten Ausführungsform möglich, im Anschluß an Trennung und/oder Elution verschiedene spektrometrische und spektroskopische Analysenverfahren durchzuführen. Besonders vorteilhaft sind hier die Verfahren der Massenspektrometrie und/oder optischen Detektion z. B. durch Lichtstreuung, insbesondere Condensation Nukleation Light Scattering Detection (Szostek et al., 1997,

Analytical Chemistry, 69, 2955-2962) und/oder elektrochemischen Detektion. So wird z. B. im Ausführungsbeispiel 1 die UV-Detektion eingesetzt.

Es kann aber ebenfalls bevorzugt sein, die Analytfraktionen im Anschluß an die Trennung einem Fraktionssammler zuzuführen, somit einzeln zu sammeln und diese einer weiteren Verwendung zuzuführen.

In einer weiteren Ausführungsform kann auch der Transfer auf ein weiteres Säulensystem zur weiteren Trennung wünschenswert sein.

Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit der parallelisierten Durchführung des Verfahrens in einer Vielzahl von CEC-Säulensystemen, die miteinander verbunden sind.

CEC-Vorrichtungen, die für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung ist die Probenaufnahmevorrichtung zur Aufnahme von Proben mit einem Volumen  $V$  von  $0.5 \text{ nl} \leq V \leq 100 \text{ } \mu\text{l}$  ausgestaltet. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von CEC-Säulen mit einer Länge von 0.1 bis 100 cm und einem Durchmesser  $\leq 500 \text{ } \mu\text{m}$ .

Weitere Ausführungsformen der Vorrichtung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Abbildungen erläutert.

Abbildung 1 zeigt ein CEC-Säulensystem, das aus einer einzelnen Säule zur Probenaufbereitung und/oder Trennung besteht.

Abbildung 2 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an einen Detektor, hier ein Massenspektrometer.

Abbildung 3 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an eine weitere Säule.

Abbildung 4 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an einen Fraktionssammler.

Abbildung 5 zeigt ein CEC-Chipsystem.

Abbildung 6 zeigt eine mögliche Ausführungsform eines CEC-Chipsystems, das mit einem Kapillarsystem gekoppelt ist.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft eine mögliche Ausführungsform eines  $\mu$ -Total Analysis Systems.

Abbildung 8 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin.

Abbildung 9 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin.

Abbildung 10 zeigt das Elektropherogramm von Nadolol.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft ein Partikel eines porösen Trägermaterials.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der Vorrichtung ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine CEC-Säule (30), die mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60) gepackt ist, taucht mit beiden Enden in Behälter (90) mit mobiler Phase (120) ein. Die Spannungsquelle (10) dient zum Anlegen einer Spannung zwischen beiden Enden der Säulen. Die Spannung ermöglicht die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses in der Säule. Zusätzlich kann noch eine Vorrichtung zur Beaufschlagung der Behälter mit Druck angebracht werden. Das Anlegen von Druck gleichmäßig an beiden Säulenenden wirkt einer Ausgasung der Pufferlösungen und somit der Bildung von Luftblasen in der Säule entgegen. Ein Säulenende ist zur Aufnahme der Probe ausgebildet. Eine Wechsellvorrichtung ermöglicht das Wechseln der Behälter (90) und somit den Austausch bzw. die Anpassung der Pufferlösungen (120) an den Verfahrensschritt. Durch Anbringen beispielsweise, wie in Abbildung 1 skizziert, eines Detektors (150) direkt auf der Säule kann der Analyt direkt detektiert und analysiert werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Vorrichtung ist es bevorzugt, daß das Säulensystem aus mindestens einer CEC-Säule zur Probenaufbereitung und mindestens einer CEC-Säule zur Trennung des Analyten besteht, die miteinander über ein Kapillarsystem verbunden sind, wobei dieses Kapillarsystem in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mindestens einen Auslaß aufweist, über den die Probenmatrix entfernt werden kann.

Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, eine CEC-Säule (30) nur zur Probenaufbereitung zu verwenden. Eine mögliche Ausführungsform ist in Abbildung 3 dargestellt. Dieses Beispiel zeigt die Kombination einer CEC-Säule (30) mit einer weiteren Säule (170), welche auf einem Chip angeordnet sind. Es ist auch möglich, den Analyten nach Abtrennung der Probenmatrix auf andere Analyse- bzw. Trennsysteme zu überführen.

Die Vorrichtung kann ebenfalls eine Kopplung des Säulensystems an mindestens einen Detektor, insbesondere Massenspektrometer und/oder Lichtstreuendetektor oder sonstigen optischen Detektor und/oder elektrochemischen Detektor (150), vorsehen. Diese bevorzugte Ausführungsform ist in Abbildung 2 anhand der Kopplung mit einem Massenspektrometer, welches eine Elektrospray-Vorrichtung (230) aufweist, skizziert. Zur Kopplung mit einem Detektor kann es bevorzugt sein, daß der Auslaß des Säulensystems einen vom Einlaß abweichenden Innen- und/oder Außendurchmesser aufweist.

Darüber hinaus ist es in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung vorgesehen, daß das Säulensystem (30) an einen Fraktionssammler und/oder ein weiteres Säulensystem gekoppelt sein kann. Dies kann beispielsweise durch direkte Kopplung geschehen. In einer bevorzugten Ausführungsform (Abbildung 4) wird zur Fraktionssammlung eine Spannung zwischen dem Einlaß der Säule und beispielsweise einer Gold-beschichteten Maldi-Platte (200) (Meeting Abstract, Advances in Mass Spectrometry, Jan 7-8, 1999, Orlando, Florida, USA) angelegt. Das Eluat wird zerstäubt und der Analyt wird gezielt in einzelnen Vertiefungen der Platte gesammelt.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform ist das CEC-Säulensystem auf einem Chip (300) angeordnet (Abbildung 5). Hier dargestellt ist ein Säulensystem bestehend aus CEC-Säule (30) mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60), einem Probenreservoir (290) und drei Pufferreservoiren (260). Das System ist so konzipiert, daß jedes Reservoir eine Elektrode aufnehmen kann. So kann wahlweise eine Spannung zwischen verschiedenen Reservoirs angelegt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Ansteuerung und Schaltung der Elektroden automatisch, wobei die genauen Schaltpläne durch Computerprogramme verwaltet werden können.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist das Chipsystem (300) mit Glaskapillaren bzw. CEC-Säulen (30) aus Fused-Silica kombiniert. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in Abbildung 6 skizziert.

Zur Herstellung der Kapillaren und Chipsysteme ist es bevorzugt, Materialien wie Kunststoff, Glas, Fused Silica, Keramik, Elastomere oder Polymere zu verwenden.

Die Herstellung geeigneter Chips kann beispielsweise durch die Anwendung der Photolithographie in Verbindung mit Ätztechniken erfolgen. Dies wurde z. B. von J. P. Landers (Handbook of Capillary Electrophoresis, 1997, CRC Press, S. 828) für die Herstellung von Chips für die Anwendung in der Kapillarelektrophorese beschrieben. Materialien wie Glas oder Fused Silica werden mit einer photoempfindlichen Substanz beschichtet. Durch Belichtung wird mit Hilfe einer Maske das gewünschte Kanalsystem auf das Substrat übertragen und z. B. in einem Bad aus verdünnter  $\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}$  in das Substrat geätzt. Für Substrate aus Fused Silica ist es notwendig, als Ätzmaske einen dünnen Gold/Chrom-Film auf das Substrat aufzutragen.

Je nach Material, das zur Herstellung der Kapillaren für die CEC-Säulen und Chipsysteme eingesetzt wird, kann es zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen der Probe mit beispielsweise freien Silanol-Gruppen der Kapillarinenseite wünschenswert sein, diese zu beschichten. Dies geschieht vorteilhaft mit PVA oder Polyacrylamid.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Vorrichtung stellt das Säulensystem eine Komponente eines Total Analysis Systems dar.

Ein mögliches Total Analysis System ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein solches System stellt eine Gesamtheit eines Analysesystems dar und kann gleichermaßen Probenaufbereitung und Analyse und ggf. vorgelagerte und/oder nachfolgende Schritte umfassen. Das in Abbildung 7 dargestellte  $\mu$ TAS umfaßt die Markierung eines Proteins mit einem Farbstoff, die Abtrennung des Farbstoffes und des nichtmarkierten Proteins über eine mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60) gepackte CEC-Säule (30) und der Detektion des markierten Proteins. Das hier skizzierte System kann z. B. auf einem Chip integriert sein, wobei die runden Vertiefungen jeweils Elektroden zur Anlegung von Spannung aufnehmen können.

Eine weitere Ausführungsform sieht eine Parallelisierung einer Vielzahl von CEC-Säulensystemen vor, in denen die Probenaufbereitung und -trennung parallel durchgeführt wird. Bei diesen Säulensystemen handelt es sich um Chipsysteme oder Kapillarsysteme oder Kombinationen aus beiden. Diese Kopplung mehrerer Systeme ist besonders im Hochdurchsatzscreening vorteilhaft, da sie die parallele Aufbereitung und Trennung einer Vielzahl von Proben erlaubt, die dann weiter untersucht werden können.

Abbildung 8 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5  $\mu$ m LiChrospher ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100  $\mu$ m. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 9 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin, welches durch Anwendung erfindungsgemäßen Einsatz der Trägermaterialien von BSA (Rinderserumalbumin) getrennt wurde. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5  $\mu$ m LiChrospher ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3



cm. Innendurchmesser: 100  $\mu\text{m}$ . Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 10 zeigt das Elektropherogramm von Nadolol. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5  $\mu\text{m}$  ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser 100  $\mu\text{m}$ . Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 2.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft ein Partikel eines porösen Trägermaterials. Die Oberfläche dieses Trägermaterials läßt sich in eine äußere Oberfläche (510) und eine Poren-  
oberfläche (540) unterteilen.

## Ausführungsbeispiel 1

### *Trennung von Digitoxigenin in Gegenwart und Abwesenheit von BSA*

#### Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  wurde mit LiChrospher ADS-C18 der Firma Merck Darmstadt gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  und eine Porengröße von 6 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat.

Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat.

Die Kontrollösung enthielt Digitoxigenin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 0.3 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die Probenlösung enthielt 1 mg/ml Digitoxigenin und 4 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin, Sigma Deisenhofen) in  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### Vorrichtung

Zur Durchführung der Trennung von Digitoxigenin wurde die in Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung eingesetzt. Die mit LiChrospher ADS-C18 gepackte Säule tauchte mit je einem Ende in Behälter zur Aufnahme von Pufferlösung ein. Mit Hilfe einer Spannungsquelle (10) wurde eine Spannung zwischen beiden Enden der Säule angelegt.

#### Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde bei 15 °C in 2 Stufen durchgeführt:

1. Die CEC-Säule wurde zunächst 40 min mit Waschpuffer äquilibriert. Während dieses Vorganges wurde eine Spannung von -5 kV angelegt und zur Verhinderung der Luftblasenbildung wurden beide Behälter mit einem Druck von 10 bar beaufschlagt. Die Stabilität der Säule wurde währenddessen durch Messung des Stroms und der UV-Absorption (bei 210 nm) kontrolliert.

- Die 2. Äquilibrationsphase dauerte 15 min, wobei eine Spannung von  $-15$  kV und ein Druck von 10 bar angelegt wurden. Der Strom und die UV-Absorption wurden ebenfalls kontrolliert.

Nach Abschluß der 2. Phase waren der Strom und die UV-Absorption stabil.

### Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf  $15^{\circ}\text{C}$  temperiert.

#### *Digitoxigenin*

Die Probe (Digitoxigenin  $0.3$  mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von  $-5$  kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von  $-15$  kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Nach 9.5 Minuten wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen  $-15$  kV und 10 bar wurden beibehalten. Digitoxigenin wurde nach 12.7 min eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 8 dargestellt.

#### *Digitoxigenin in Anwesenheit von BSA*

Die Probe (1 mg/ml Digitoxigenin und 4 mg/ml BSA jeweils in  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von  $-5$  kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Durch Aufbringen des Waschpuffers wird anschließend die Probe bei einer Spannung von  $-15\text{ kV}$  und unter Anlegen eines Druckes auf beiden Enden der Säule von  $10\text{ bar}$  gewaschen und somit das BSA entfernt. Nach 10 Minuten wurde der Waschpuffer gegen einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen  $-15\text{ kV}$  und  $10\text{ bar}$  wurden beibehalten. Digitoxigenin wurde nach  $12.6\text{ min}$  eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 9 dargestellt.

## Ausführungsbeispiel 2

### *Trennung von Nadolol*

#### Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von  $8.3\text{ cm}$  und einem Innendurchmesser von  $100\text{ }\mu\text{m}$  wurde mit Licrospher ADS-C18 der Firma Merck Darmstadt gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von  $5\text{ }\mu\text{m}$  und eine Porengröße von  $6\text{ nm}$ .

Der Waschpuffer bestand aus  $5\%$  Acetonitril,  $95\%$  Wasser,  $10\text{ mM}$  Ammoniumacetat.

Der Elutionspuffer bestand aus  $60\%$  Acetonitril,  $40\%$  Wasser,  $10\text{ mM}$  Ammoniumacetat.

Die Lösung enthielt Nadolol (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von  $0.3\text{ mg/ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ .

#### Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

#### Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt.

#### Trennung

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf  $15^\circ\text{C}$  temperiert.

Nadolol (1 mg/ml) wurde elektrokinetisch unter Anlegen einer Spannung von  $-5\text{ kV}$  für 3 sec geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Durch Aufbringen des Waschpuffers wird anschließend die Probe bei einer Spannung von  $-15\text{ kV}$  und unter Anlegen eines Druckes auf beiden Enden der Säule von 10 bar gewaschen und somit das BSA entfernt. Nach 10 Minuten wurde der Waschpuffer gegen einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen  $-15\text{ kV}$  und 10 bar wurden beibehalten. Nadolol wird nach 13,99 min eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 10 dargestellt.

### Ansprüche

1. Verwendung von Trägermaterial in der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC), dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial eine Oberfläche besitzt, die Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.
2. Verwendung von Trägermaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial porös ausgestaltet ist, und die Oberfläche sich aus einer äußeren Oberfläche (510) und einer Porenoberfläche (540) zusammensetzt.
3. Verwendung von Trägermaterial nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche mit hydrophoben und/oder hydrophilen Gruppen und/oder Ionenaustauschergruppen und/oder Affinitätsliganden derivatisiert und/oder funktionalisiert ist.
4. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität homogen und/oder heterogen auf der Oberfläche verteilt sind.
5. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Alkylresten der Länge C1 bis C50, vorzugsweise C4 bis C22, besonders bevorzugt C4, C8 und C18 derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.
6. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Diolen derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.

7. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen kugelförmig ausgestaltet ist und einen Außendurchmesser  $D$  von  $0.05 \leq D \leq 20 \mu\text{m}$ , bevorzugt  $1 \leq D \leq 5 \mu\text{m}$ , besonders bevorzugt  $0.5 \leq D \leq 3 \mu\text{m}$ .
8. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Porendurchmesser  $d$  von  $0.5 \leq d \leq 100 \text{ nm}$ , bevorzugt von  $1 \leq d \leq 50 \text{ nm}$ , besonders bevorzugt von  $2 \leq d \leq 6 \text{ nm}$ .
9. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es aus hydroxylhaltigen Materialien mit Umkehrphasen besteht, wobei die Umkehrphasen auf die Porenoberflächen beschränkt sind und aus Fettsäureestern bestehen.
10. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es aus mit 2,3-Dihydroxypropoxy-Gruppen modifiziertem Kieselgel besteht.
11. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es aus mit 2,3-Dihydroxypropoxy-Gruppen modifiziertem Glas besteht.
12. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem hydroxylgruppenhaltigen organischen organischen Polymer oder Copolymer besteht.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Trägermaterial in der Kapillarelektrochromatographie (CEC), dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial eine Oberfläche besitzt, die Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.



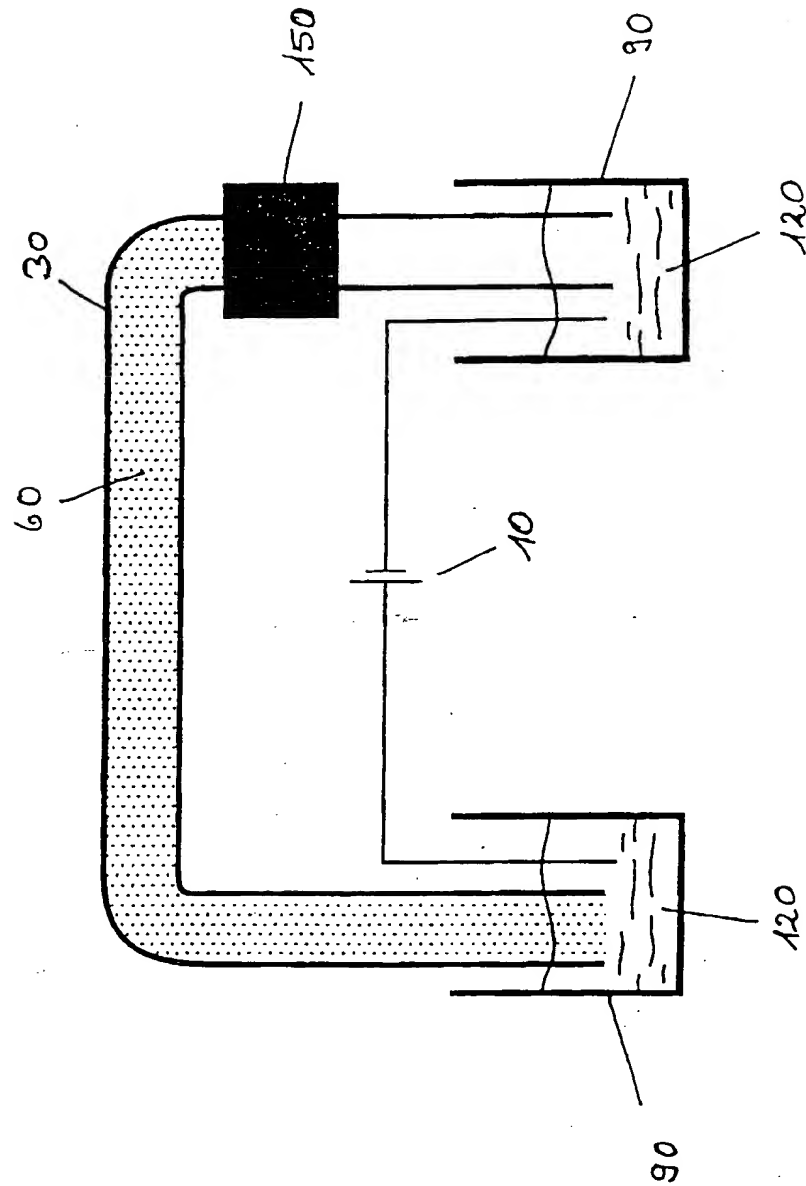


Abbildung 1



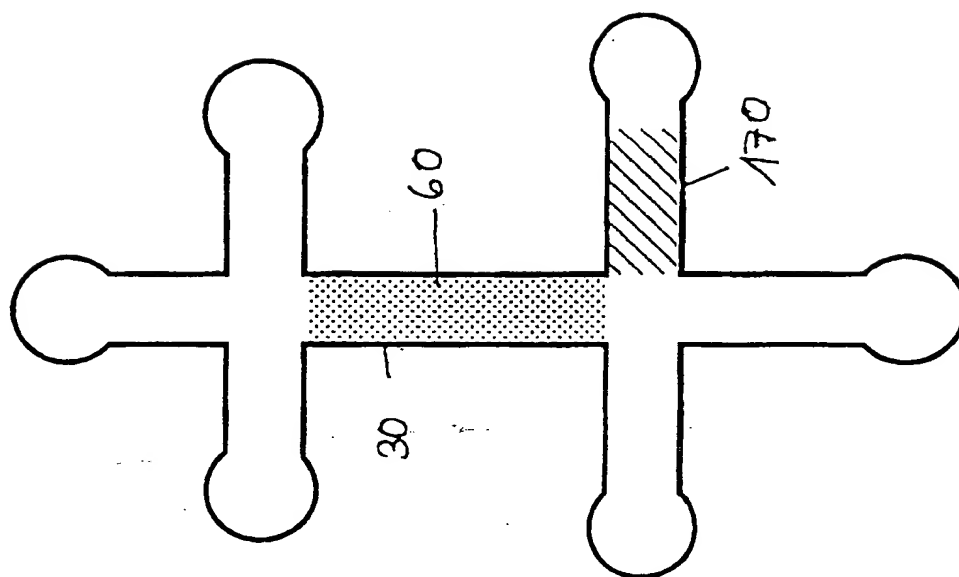


Abbildung 3

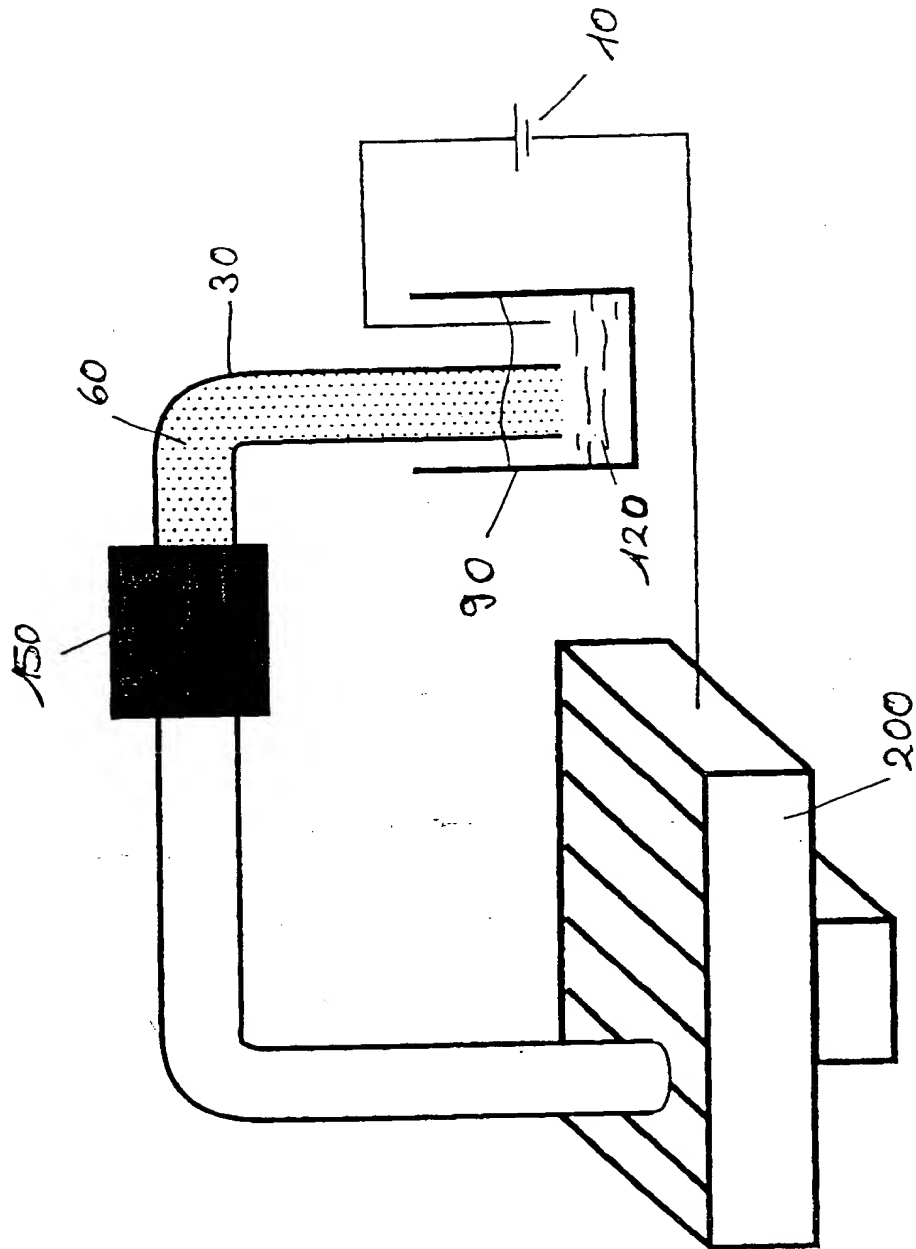


Abbildung 4

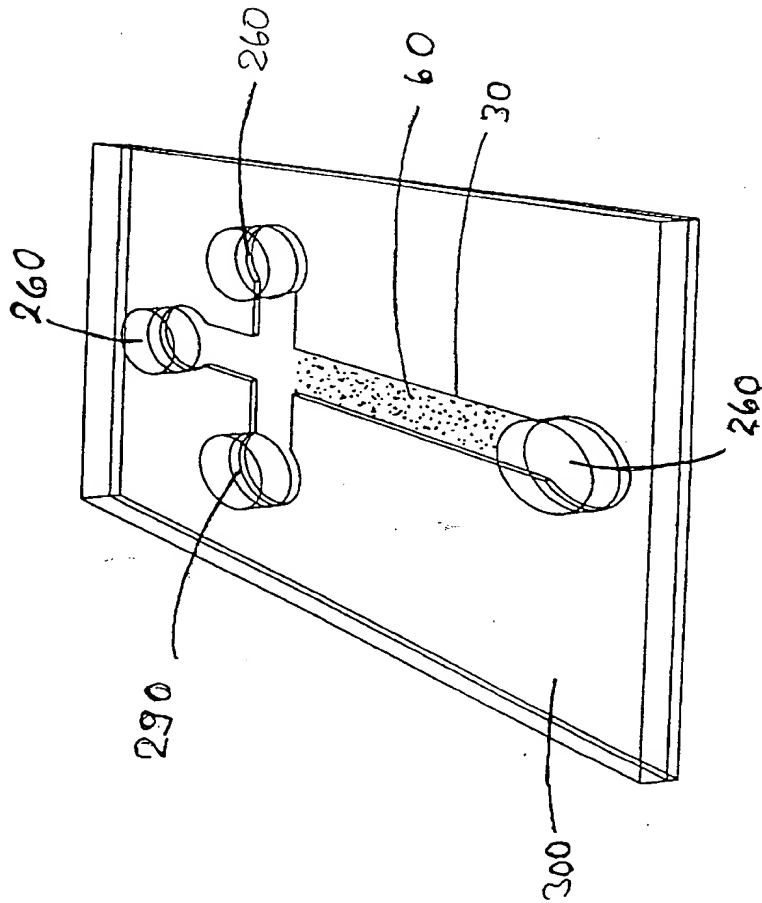


Abbildung 5

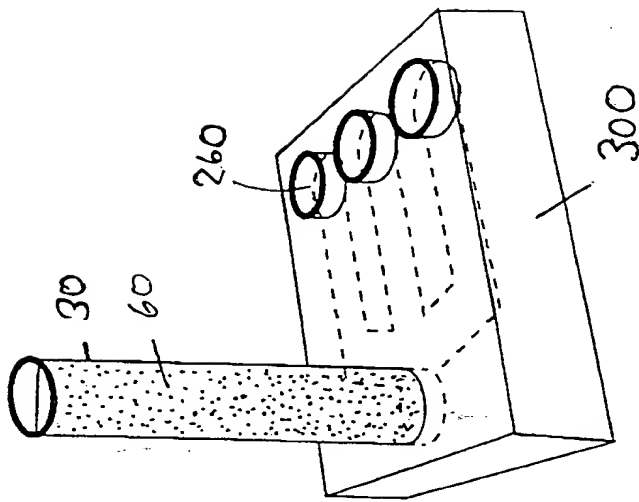


Abbildung 6

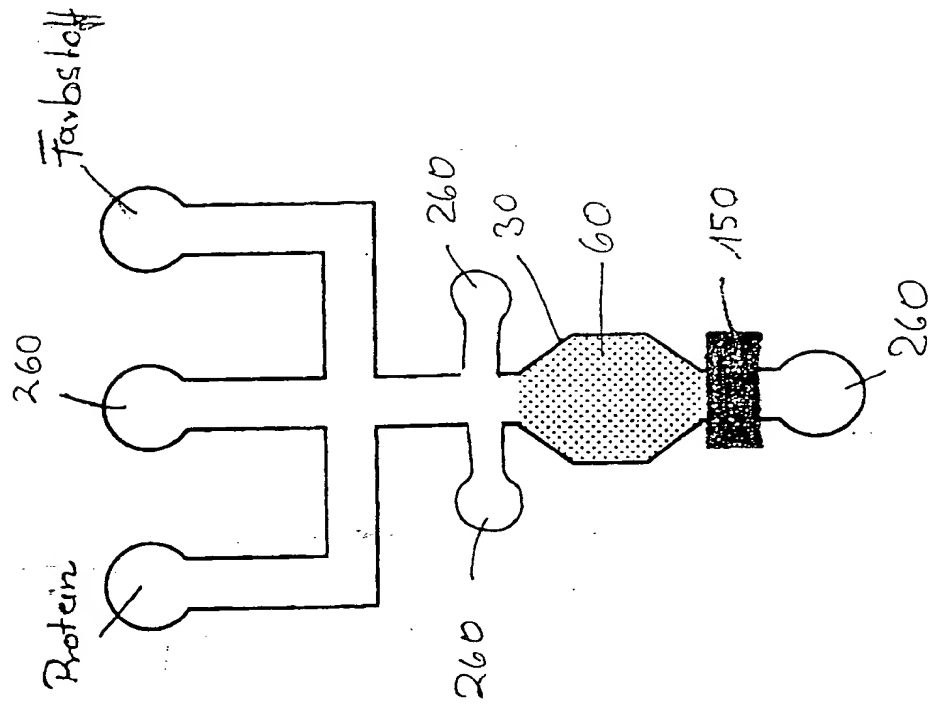


Abbildung 7

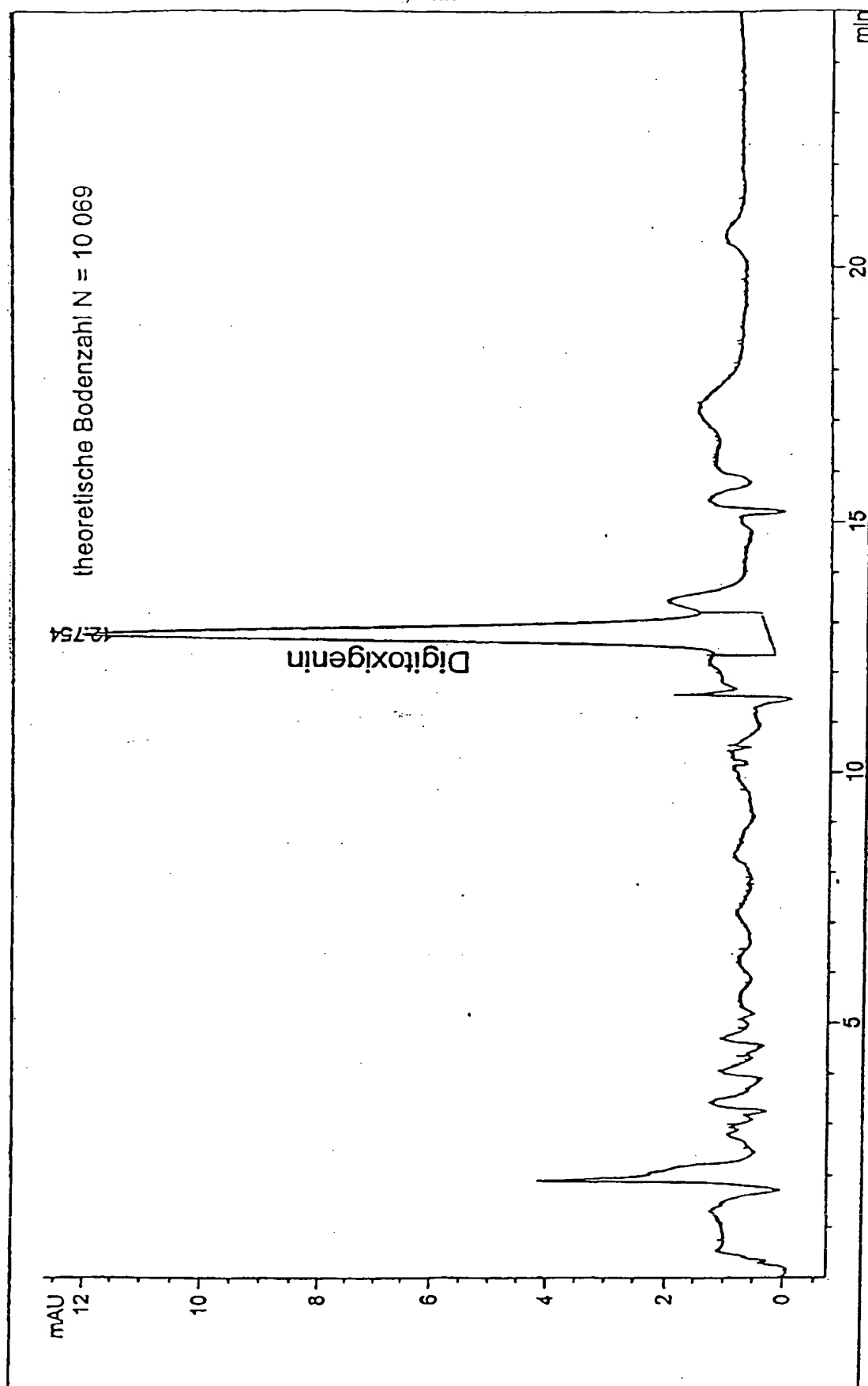


Abbildung 8



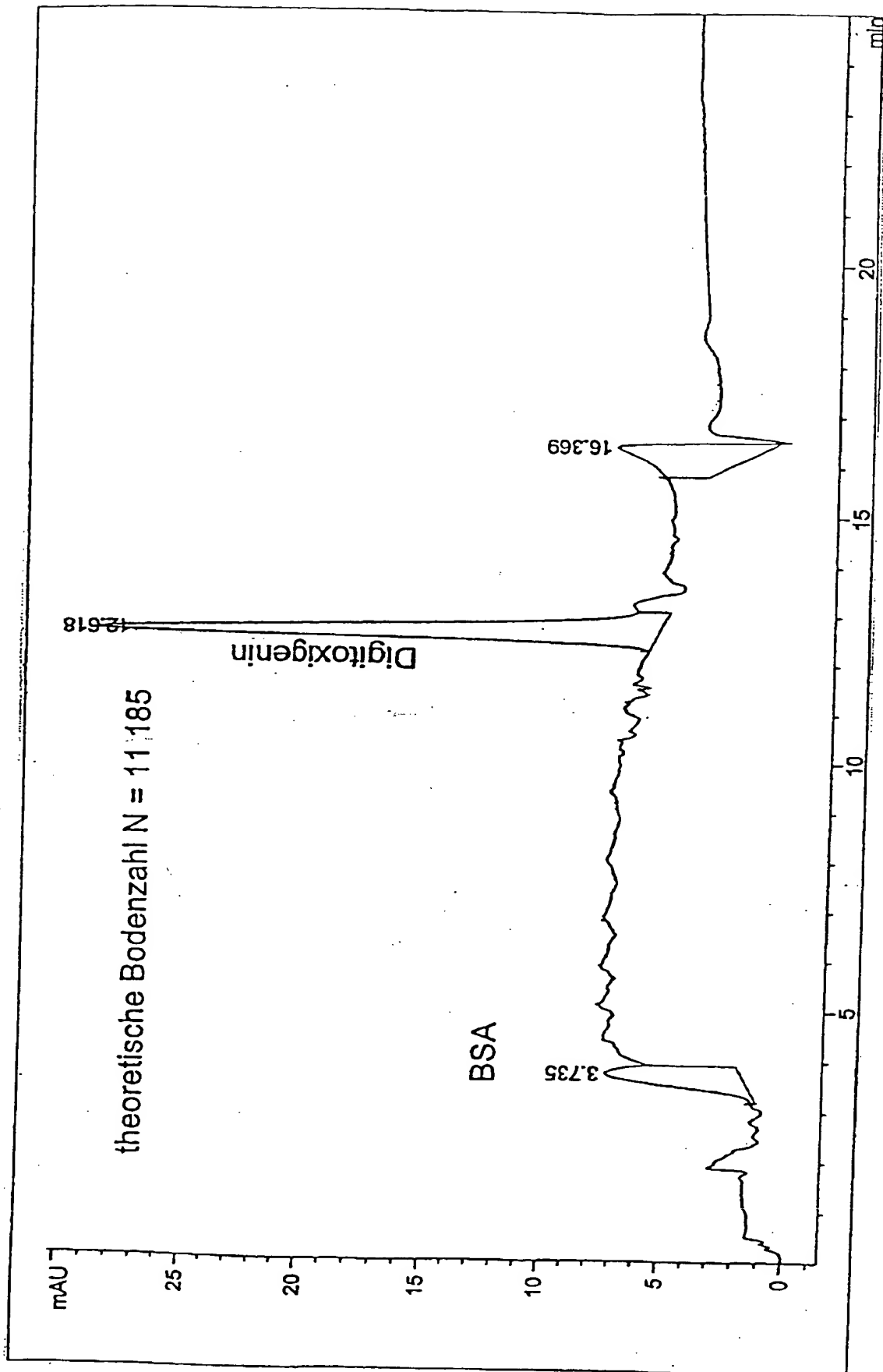


Abbildung 9

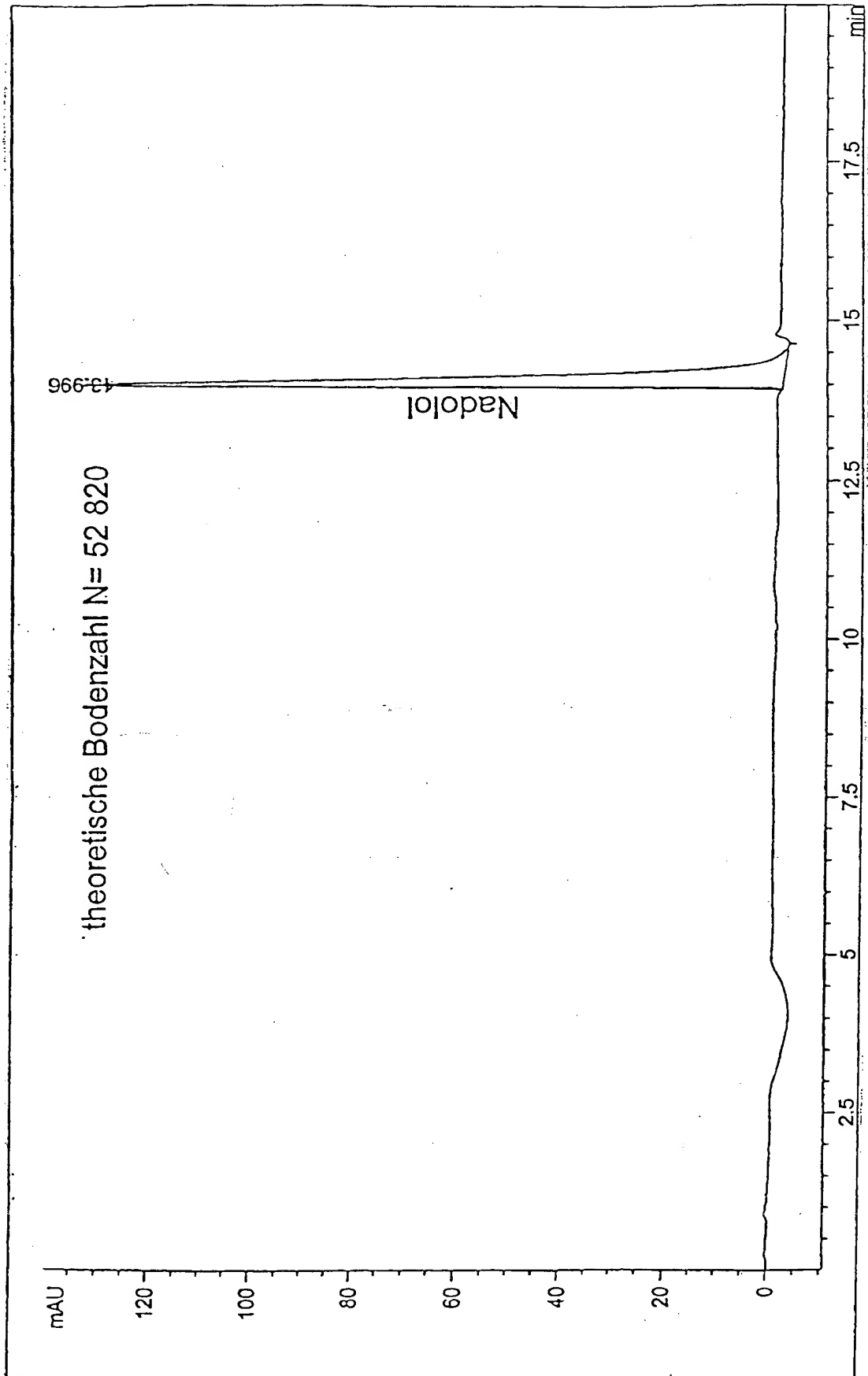


Abbildung 10

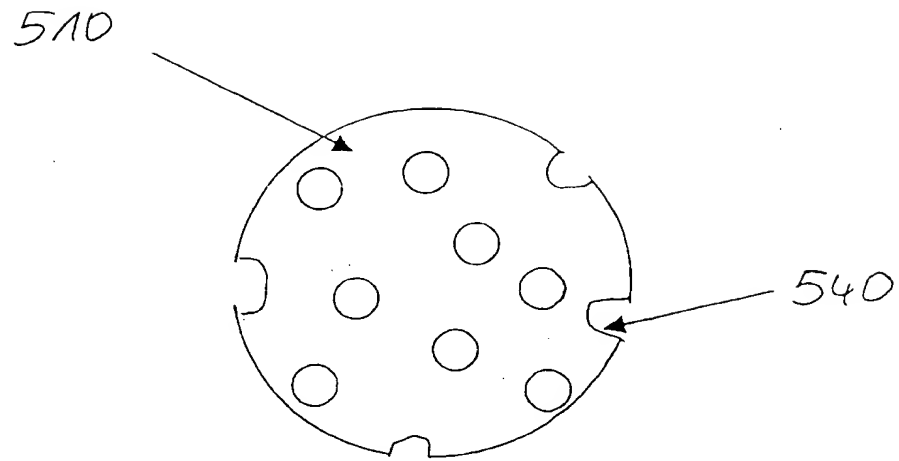


Abbildung 11